

HPLC 法分析乳清蛋白对糖尿病模型小鼠血浆氨基酸的影响

李伟¹ 韩婷¹ 秦立强^{2*}

(¹同济大学附属第十人民医院营养科, 上海 200072; ²苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院, 江苏苏州 215123)

摘要 寻求有效的氨基酸分离方法, 并探讨乳清蛋白对 2 型糖尿病防治的作用机制。用 HPLC 法分析乳清蛋白中氨基酸组分及含量; 分别以 0%、10%、20% 和 40% 的乳清蛋白 (WP) 灌胃 1 型、2 型糖尿病模型组、正常组小鼠 4 周后, 观察各组血浆氨基酸的变化。乳清蛋白中亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸分别占氨基酸总量的 14.40%、5.93% 和 5.32%, 即支链氨基酸的含量为 25.65%。无论是正常小鼠还是造模小鼠, 乳清蛋白灌胃后血浆中支链氨基酸 (BACC) 含量上升, 并且灌胃浓度越高, BACC 含量越高。另外, 造模小鼠血液中 BACC 含量高于正常小鼠。乳清蛋白富含的 BACC 灌胃后增加了模型小鼠血浆氨基酸水平。

关键词 HPLC; 糖尿病; 氨基酸; 乳清蛋白; 支链氨基酸

糖尿病是严重威胁人类健康的一种慢性病, 目前全世界约有 2.85 亿糖尿病患者^[1], 而我国成人 2 型糖尿病患病率高达 9.7%, 其中 60 岁以上的老人患病率高达 20.4%^[2]。2 型糖尿病和饮食因素密切相关, 本课题组做的 meta 分析提示摄入奶制品可以降低 2 型糖尿病的患病风险^[3], 前期研究提示摄入乳清蛋白增加了正常小鼠胰岛素的敏感性并能改善脂代谢^[4]。糖尿病不仅会对糖脂代谢还会对蛋白质和氨基酸的代谢产生影响。当机体氨基酸浓度充足时骨骼肌会增加对葡萄糖的摄取和胰岛素的活性, 从而促进蛋白质的合成代谢^[5], 摄入乳清蛋白可增加肌肉蛋白质的合成^[6]。氨基酸是机体活动的重要物质, 近年来作为信号分子在胰岛素分泌和葡萄糖代谢的信号传导中起着非常重要的作用^[7]。本项研究拟检测乳清蛋白及糖尿病模

型小鼠血浆中氨基酸的水平, 以进一步探讨乳清蛋白对 2 型糖尿病防治的作用机制。

目前氨基酸常用的检测技术有高压液相色谱法 (high pressure liquid chromatography, HPLC)、氨基酸分析仪法和液相色谱-质谱/质谱联用的方法。氨基酸分析仪法操作简单、不需柱前衍生、可以批量检测, 但成本较高、检测时间相对较长、分辨率低; 液相色谱-质谱/质谱联用法方便准确, 但成本较高; 而 HPLC 法具有检测成本低、重复性好、灵敏度高等优点常作为检测氨基酸比较通用的方法^[8]。本研究拟采用 HPLC 来检测乳清蛋白中氨基酸组分及含量, 并针对乳清蛋白灌胃后各组血浆氨基酸水平进行分析, 进一步探讨乳清蛋白对糖尿病防治的作用机制。

* 该项目为国家自然科学基金 (30771808)、苏州大学医学发展基金 (EE126712) 资助项目

作者简介: 李伟 (1982-), 同济大学附属第十人民医院营养科, 硕士, 医师 18018500185 winni0423@126.com
通讯作者, qinliqiang@suda.edu.cn

1 材料与方法

1.1 动物实验

1.1.1 模型制备

STZ 采用 0.1mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (PH4.2) 配制。柠檬酸钠 2.1g 溶于 100ml 双蒸水 (A 液), 柠檬酸三钠 2.94g 溶于 100ml 双蒸水 (B 液), 将 A 液和 B 液以 1:1.321 体积比混合, 以 10% 碳酸氢钠调 PH 至 4.2, 即为所需的柠檬酸盐缓冲液。临用前将 100mg STZ 溶于 10 ml 上述柠檬酸盐缓冲液, 用前再过滤除菌。整个配制过程应在冰盒上操作。

8 周龄 SPF 级健康雄性 ICR 小鼠购自中国科学院上海实验动物中心, 饲养于 12h 光照/12h 黑暗、相对湿度 40% -70%、室温 18-22℃ 的标准化动物房内, 动物适应 1 周后进行实验。ICR 小鼠一次腹腔注射 100mg/kg 体重配制好的 STZ 制备 2 型糖尿病模型, 腹腔注射 160mg/kg 体重制备 1 型糖尿病模型^[7,8], 三天后测空腹血糖 >5mmol/L 即造模成功, 进入实验。

1.1.2 方法

共有三组小鼠进入实验, 分别是正常组、1 型糖尿病模型组、2 型糖尿病模型组, 每组 32 只小鼠分别分为四个亚组 (每组 8 只), 分别以 0%、10%、20% 和 40% 的 WP 0.5ml 灌胃, WP 水溶液现配现用, 灌胃时间为每天下午 4:00 左右, 持续 4 周。实验开始前和开 4 周后结束实验, 空腹摘眼球取血血浆冷冻保存。

1.2 HPLC 分析

1.2.1 仪器与试剂

Waters 2695 alliance 高效液相色谱仪, Waters 2487 紫外检测器, Waters 2475 荧光检测器, 自动进样器 (SM7, Waters); 全自动型时间分辨和稳态荧光光谱仪 (FLS920, EDINBURGH, Scotland, UK); 高压微射流设备 (110S, NEWTON, MASSACHUSETTS, USA); 超纯水系统 (Barnstead D898233,

USA)。色谱纯乙腈 (纯度 $\geq 99.9\%$, 型号: 8002G-04, 天津市康科德科技有限公司), C18 Venusil-AA 氨基酸分析柱和分析包 (4.6 mm \times 250 mm \times 5 μ m, 天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

氨基酸衍生的方法采用 PITC 法 (异硫氰酸苯酯), 用 C18 Venusil-AA 氨基酸分析柱在高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司) 上进行分析。

1.2.2 溶液配制

1) 三乙胺乙腈溶液: 三乙胺 1.4ml, 加乙腈 8.6ml, 混匀

2) 异硫氰酸苯酯乙腈溶液: 取异硫氰酸苯酯 1 瓶, 加乙腈 2ml, 混匀

3) 流动相 A: 称取 15.2g 醋酸钠, 加水 1850 ml, 溶解后用冰醋酸 PH 至 6.5, 然后加乙腈 140ml, 混匀, 用 0.45 μ m 滤膜过滤

4) 流动相 B: 80% 乙腈

5) 正亮氨酸内标溶液: 称取正亮氨酸 10mg, 加 0.1mol/L 盐酸溶液 10ml 使溶解, 混匀

1.2.3 样品处理

1) 乳清蛋白水解: 精确称取乳清蛋白粉 2mg, 溶于 1ml PH 8.0 的 Tris-HCl 中, 将其配成 2mg/ml 的乳清蛋白溶液。在配制好的溶液中分别加入 3.5 μ l 的胰蛋白酶、10 μ l 的肽酶、100 μ l 的 α -糜蛋白酶, 混匀后放在 37 $^{\circ}$ C 水浴 24 小时, 于 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

2) 血浆沉淀蛋白: 取血浆样品 80 μ l, 加入浓度为 12mol/L 高氯酸 100 μ l 混匀, 15000 r/min 离心 10min, 将上清移入新的离心管中于 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.2.4 氨基酸标准溶液和样品溶液的衍生化处理

准确取氨基酸标准品溶液及样品 200 μ l, 于 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 加入 20 μ l 的正亮氨酸内标, 100 μ l 的三乙胺乙腈, 100 μ l 的异硫氰酸苯酯乙腈混匀, 室温反应 1 小时, 加入 400 μ l 正己烷, 振摇孵育 10min, 吸取下层衍生产物苯基硫代氨甲酰-氨基酸溶液 (PTC-AA), 用 0.45 μ m 针式过滤器过

滤，于4℃储存备用。

1.2.5 色谱条件及分离测定

- 1) 色谱柱：Venusil-AA 氨基酸分析柱 (4.6 mm×250 mm×5μm)。
- 2) 检测波长：254nm。
- 3) 柱温：40℃。
- 4) 梯度（见表1）：
- 5) 分离测定：取滤液 2μl，注入高效液相色谱仪，记录色谱图。

表 1 流动相梯度

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	100	0
2	100	0
15	90	10
25	70	30
33	55	45
33.1	0	100
38	0	100
38.1	100	0
45	100	0

1.2.6 回收率的测定

准确配制缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu) 和异亮氨酸 (Ile) 三种混合支链氨基酸标准品，用 0.1% 的盐酸溶液稀释成浓度为 0、

50、100、200、400 和 1000 μmol/L 的标准品，分别将 100、200 和 1000 μmol/L 的 Val、Leu 和 Ile 混合标准品加入到已知浓度的同一样本中测定回收率。

1.2.7 HPLC 分析

采用 HPLC 测定乳清蛋白中氨基酸组分及含量，并对 1.1.2 中收集的血浆进行测定，分析其中氨基酸水平。

1.3 统计分析

所有数据用 Mean ± SD 表示，采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。差异显著性检验采用单因子方差分析(one way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 标准品氨基酸分析

根据材料与方法的叙述，用 HPLC 专用色谱柱进行了氨基酸标准品的分析，色谱图如下（图1），乳清蛋白中富含支链氨基酸，本研究针对支链氨基酸进行分析，可以看出 Val 在 23.58min 出峰，Ile 和 Leu 出峰相隔很近分别在 26.52min 和 26.83min 出峰，本方法具有很好的分离效果，混标中每种氨基酸都得到了有效的分离，每种氨基酸所对应的峰近似于对称形正态分布曲线。

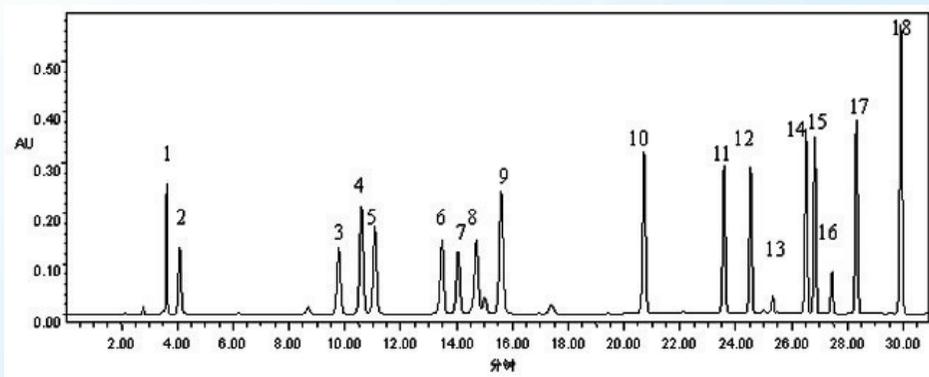


图 1 18 种混合性氨基酸标准品的色谱图

1. 天门冬氨酸 Asp, 2. 谷氨酸 Glu, 3. 丝氨酸 Ser, 4. 甘氨酸 Gly, 5. 组氨酸 His,
6. 精氨酸 Arg, 7. 苏氨酸 Thr, 8. 丙氨酸 Ala, 9. 脯氨酸 Pro, 10. 酪氨酸 Tyr,
11. 缬氨酸 Val, 12. 甲硫氨酸 Met, 13. 胱氨酸 Cys, 14. 异亮氨酸 Ile, 15. 亮氨酸 Leu,
16. 正亮氨酸 Nle, 17. 苯丙氨酸 Phe, 18. 赖氨酸 Lys

2.2 回收率分析

由于乳清蛋白中富含支链氨基酸，本研究测定了支链氨基酸的回收率，选取了50 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、1000 $\mu\text{mol/L}$ 三个浓度点来分别测定缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸的回收率，结果见表2。可以看出三种支链氨基酸都有很高的回收率，基本都在90%以上，尤其是1000 $\mu\text{mol/L}$ 的回收率最高。

表2 不同浓度缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸的回收率

浓度(μ)	回收率(%)		
	缬氨酸	异亮氨酸	亮氨酸
50	92.96	84.61	94.08
200	107.56	92.77	91.98
1000	103.54	100.08	103.40

2.3 乳清蛋白氨基酸组分及含量分析

本研究中正亮氨酸作为内标物用来计算其他氨基酸的含量，用含对照品和内标物的对照溶液所得色谱峰响应值，按下式算出校正因子(f)：

$$f = (A_s/m_s) / (A_r/m_r)$$

A_s 和 A_r 分别为内标物和对照品的峰面积或峰高， m_s 和 m_r 分别为加入内标物和对照品的量。

再取各品种项下含有内标物的待测组分溶液进样，记录色谱图，根据含内标物的待测组分溶液色谱峰响应值，计算含量(m_i)：

$$m_i = f \times A_i / (A_s/m_s)$$

A_i 和 A_s 分别为供试品和内标物的峰面积或峰高， m_s 为加入内标物的量。必要时，再根据稀释倍数、取样量和标示量折算成为标示量的百分含量，或根据稀释倍数和取样量折算成百分含量。

乳清蛋白经胰蛋白酶、肽酶、 α -糜蛋白酶处理后测定其氨基酸组分，图2和表3显示了典型的乳清蛋白溶液中氨基酸组分的色谱图和乳清蛋白溶液中氨基酸的含量。本研究中内标物的校正因子是0.0859，根据公式可计算氨基酸的含量。乳清蛋白富含的氨基酸种类多，赖氨酸含量最高占17.16%，缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸三种支链氨基酸的含量占25.65%，其中亮氨酸约占14.40%，异亮氨酸占5.93%，缬氨酸占5.32%。

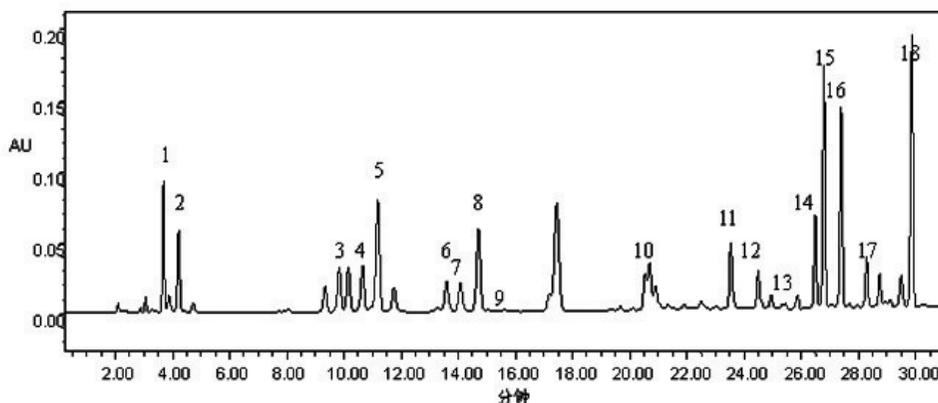


图2 2mg/ml 乳清蛋白溶液中氨基酸的色谱图

1. 天门冬氨酸 Asp, 2. 谷氨酸 Glu, 3. 丝氨酸 Ser, 4. 甘氨酸 Gly, 5. 组氨酸 His,
6. 精氨酸 Arg, 7. 苏氨酸 Thr, 8. 丙氨酸 Ala, 9. 脯氨酸 Pro, 10. 酪氨酸 Tyr,
11. 缬氨酸 Val, 12. 甲硫氨酸 Met, 13. 胱氨酸 Cys, 14. 异亮氨酸 Ile,
15. 亮氨酸 Leu, 16. 正亮氨酸 Nle, 17. 苯丙氨酸 Phe, 18. 赖氨酸 Lys

表 3 2mg/ml 乳清蛋白溶液中氨基酸的含量及浓度

标号	峰名称	所占比例 (%)	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
1	天门冬氨酸 Asp	5.99	116.85
2	谷氨酸 Glu	5.17	100.84
3	丝氨酸 Ser	4.12	80.35
4	甘氨酸 Gly	4.35	84.78
5	组氨酸 His	11.05	215.60
6	精氨酸 Arg	3.14	61.33
7	苏氨酸 Thr	3.06	59.75
8	丙氨酸 Ala	8.23	160.54
9	脯氨酸 Pro	0.15	2.86
10	酪氨酸 Tyr	4.20	81.96
11	缬氨酸 Val	5.32	103.75
12	甲硫氨酸 Met	3.15	61.40
13	胱氨酸 Cys	1.06	20.68
14	异亮氨酸 Ile	5.93	115.62
15	亮氨酸 Leu	14.40	280.90
16	苯丙氨酸 Phe	3.52	68.75
17	赖氨酸 Lys	17.16	334.79

2.3 血浆样品中氨基酸组分及含量分析

血浆样品按 1.2.2 样品处理所提供方法处理后测定，其氨基酸的色谱图见图 3，可以看出血浆样品中三种支链氨基酸都得到了很好的分离。从图 4 可以看出无论是正常小

鼠还是造模小鼠，乳清蛋白灌胃后血浆中支链氨基酸含量上升，并且灌胃浓度越高，支链氨基酸含量越高。另外，造模小鼠血液中支链氨基酸含量高于正常小鼠，但无统计学差异。

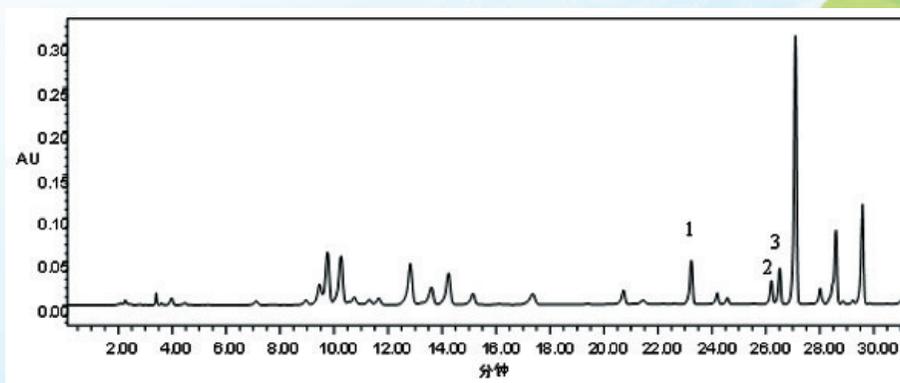


图 3 血浆中氨基酸的色谱图

1. 缬氨酸 Val, 2. 异亮氨酸 Ile, 3. 亮氨酸 Leu, 4. 内标: 正亮氨酸 Nle

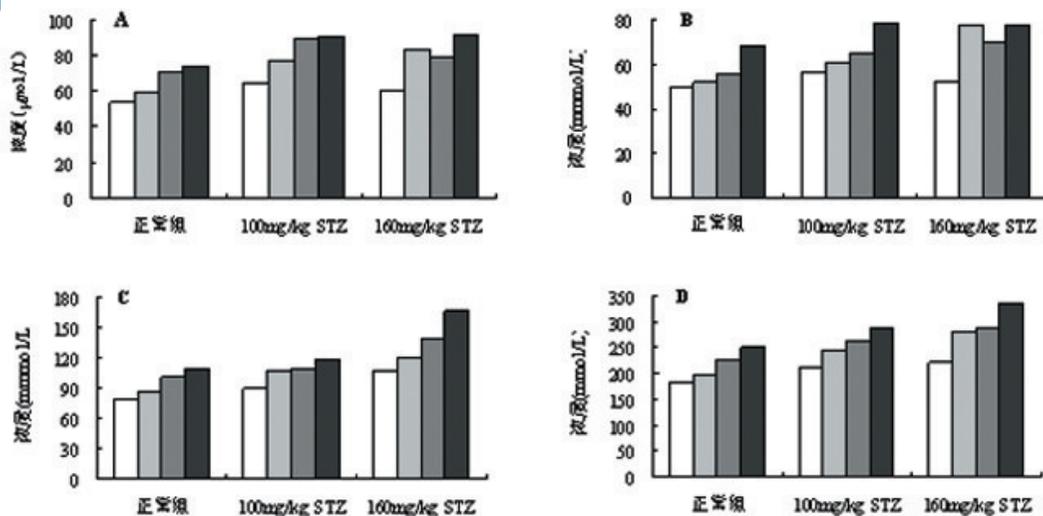


图4 不同浓度乳清蛋白灌胃后小鼠血液中亮氨酸(A)、异亮氨酸(B)、缬氨酸(C)、支链氨基酸(D, 亮氨酸+异亮氨酸+缬氨酸)的浓度, 0%乳清蛋白(对照组); 10%乳清蛋白; 20%乳清蛋白; 40%乳清蛋白。

3 讨论

本课题前期研究发现乳清蛋白可改善正常小鼠血糖和脂代谢, 而氨基酸作为一种改善骨骼肌蛋白合成的重要物质备受关注, 为了进一步探讨乳清蛋白的作用机制, 本研究首先测定了乳清蛋白的氨基酸组分及含量。目前常用的检测氨基酸的方法有很多, HPLC 由于具有分析速度快、检测性能好、分离效能高、检测成本低、适用范围广及分析精度高等特点在各领域得到了广泛的应用, 现已成为不可或缺的分段手段^[8]。本研究采用 HPLC 分析乳清蛋白中氨基酸组分及含量。氨基酸衍生的常用方法有 OPA 法(邻苯二甲醛)、PITC 法(异硫氰酸苯脂)、2, 4-二硝基氟苯法。OPA 法反应速度快, 但对于赖氨酸及胱氨酸衍生物荧光较弱, 灵敏度低, 甘氨酸、赖氨酸衍生物不稳定, 同时样品中的盐分影响衍生效果; 2, 4-二硝基氟苯法残留试剂对柱效影响较大, 影响检测结果; PITC 法, 具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点^[8]。综合以上本研究采用了 PITC 法进行氨基酸衍生, 18 种氨基

酸标准品都得到了很好的分离, 每种氨基酸所对应的峰近似于对称形正态分布曲线, 用 HPLC 分析氨基酸分离效果好。由于血浆中的蛋白质等生物大分子会不可逆的吸附在反相柱上, 使色谱柱柱压升高, 柱效下降, 所使用寿命缩短。故分析前要先去除血浆中的蛋白质等大分子物质。目前常用的去蛋白质的方法有乙醇、甲醛、乙腈和高氯酸等, 经过预实验, 发现在本研究条件下高氯酸去除蛋白质的效果最好^[9]。

乳清蛋白中氨基酸种类齐全, 必须氨基酸组成模式与人体相似, 容易消化, 具有极高的生物利用效价。乳清蛋白中氨基酸尤其是 BACC 含量丰富, 缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu) 和异亮氨酸 (Ile) 含量均高于 FAO/WHO 推荐量, Leu 和 Ile 含量均高于酪蛋白和大豆蛋白^[10]。本研究所用的乳清蛋白中 Leu、Ile、Val 分别占氨基酸总量的 14.40%、5.93%和 5.32%, 即 BACC 的含量为 25.65%。我们的结果和文献报道一致^[11,12]。

本研究发现乳清蛋白灌胃后血浆中支链氨基酸含量上升, 并且灌胃浓度越高, BACC 含量越高。Nilsson 研究发现摄入乳清蛋白后胰岛素反应和早期血浆氨基酸增加尤其是乳

清蛋白富含的 BACC 增加高度相关^[13]。Veldhorst 的研究发现摄食 10% 乳清蛋白增加了血浆中苏氨酸、异亮氨酸、色氨酸、亮氨酸和赖氨酸水平^[14]。同样, 本研究中同一批小鼠随着乳清蛋白浓度的增加血浆中 BACC 的含量也逐渐增加, 因此乳清蛋白促胰岛素的分泌可能有赖于积极快速的释放某些氨基酸。

另外, 本研究发现糖尿病小鼠的血浆中 BACC 水平高于对照组, Kuzuya 的在糖尿病大鼠中也发现了该现象, 这可能是糖尿病影响了调节 BACC 的代谢的支链 α -酮酸脱氢酶^[15]。Krebs^[16] 研究发现血浆氨基酸水平增加会阻碍肌肉对葡萄糖的转运吸收, 减少肌糖原合成, 诱发出肌肉组织的胰岛素抵抗。这是由于胰岛素绝对或相对不足导致葡萄糖、脂肪酸的氧化受阻, 蛋白质分解增加, 故需要动员大量 BACC 入血作为能源来补充。另一方面, 胰岛素不足导致肌肉组织从血中摄取 BACC 受到抑制, 使肌肉分解代谢亢进, 产生过多的氨基酸入血, 故使血浆中 BACC 浓度增加。马乃诚^[17] 的研究发现控制不良的糖尿病者血浆 BACC 水平与正常人相比明显增加, 控制良好组与控制不良组相比 BACC 浓度明显降低。本研究中 160mg/kg-STZ 组的血浆 BACC 水平大于 100mg/kgSTZ 组, 而后者又大于正常小鼠组, 这可能是由于一方面补充的乳清蛋白增加了血浆 BACC 水平; 另一方面由于模型小鼠本身的血浆 BACC 水平高于正常小鼠。

本研究发现 HPLC 可以作为一种简单快速的氨基酸分析方法, 摄取乳清蛋白可增加小鼠血浆中氨基酸水平尤其是支链氨基酸水平, 本研究为以后继续研究乳清蛋白对糖尿病防治的作用机制提供了方向和一定的科学依据, 今后将进一步研究乳清蛋白中富含的 BACC 尤其是亮氨酸的作用机制。

参考文献

[1] Type 2 diabetes epidemic: a global

education. Lancet [J]. 2009; 14; 374 (9702): 1654.

[2] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. N Engl J Med; 362: 1090-101.

[3] Tong X, Dong JY, Wu ZW et al. Dairy consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of cohort studies [J]. Eur J Clin Nutr. 2011 Sep; 65 (9): 1027-31.

[4] 李伟, 童星, 徐加英, 秦立强. 乳清蛋白对正常小鼠血糖和脂代谢的影响 [J]. 中国乳品工业 2010; 28 (3): 21-23.

[5] Solerte SB, Fioravanti M, Locatelli E, et al. Improvement of blood glucose control and insulin sensitivity during a long-term (60 weeks) randomized study with amino acid dietary supplements in elderly subjects with type 2 diabetes mellitus [J]. Am J Cardiol. 2008; 101 (11A): 82E-88E.

[6] Coker RH, Miller S, Schutzler S, Deutz N, Wolfe RR. Whey protein and essential amino acids promote the reduction of adipose tissue and increased muscle protein synthesis during caloric restriction-induced weight loss in elderly, obese individuals [J]. Nutr J. 2012; 11; 11: 105.

[7] 吕子凡, 郭非凡. 氨基酸感应与脂代谢调控的研究进展 [J]. 生命科学. 2013; 25 (2): 152-157.

[8] 周文芳. 血浆中氨基酸检测技术探讨 [J]. 氨基酸和生物资源. 2012; 34 (3): 25-28.

[9] Pi LG, Tang AG, Mo XM et al. More rapid and sensitive method for simultaneous determination of tryptophan and kynurenic acid by HPLC. Clin Biochem [J]. 2009; 42 (4-5): 420-5.

[10] Gilani GS, Xiao C, Lee N. Need for accurate and standardized determination of amino acids and bioactive peptides for evaluating